

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 2000-078997

(43)Date of publication of application : 21.03.2000

(51)Int.Cl.

C12P 21/02

(21)Application number : 10-250888

(71)Applicant : DAINICHISEIKA COLOR & CHEM MFG
CO LTD

(22)Date of filing : 04.09.1998

(72)Inventor : ISONO YASUYUKI
FUKUSHIMA KENJI
HOSHINO AKIRA

(54) PREPARATION OF LOWER ALKYL ESTER OF ASPARTYLPHENYLALANINE

(57)Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To provide a method for synthesizing a dipeptide (a lower alkyl ester of aspartylphenylalanine) by using a hydrolase (a protease) in the high concentration of a substance.
SOLUTION: This method for producing a lower alkyl ester of aspartylphenylalanine by reacting (A) an N-substituted aspartic acid with (B) a hydrochloride of a lower alkyl ester of phenylalanine in the presence of a protease to synthesize a peptide comprises using a paste comprising a substrate A, a substrate B, and an alkaline aqueous solution in an amount in which the concentrations of these substrates become the concentrations more than the solubility in water respectively, as the enzymatic reaction substrate.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination] 24.08.2001

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号
特開2000-78997
(P2000-78997A)

(43) 公開日 平成12年3月21日(2000.3.21)

(51) Int.Cl.⁷

C 1 2 P 21/02

識別記号

F I

C 1 2 P 21/02

テマコード^{*}(参考)

B 4 B 0 6 4

審査請求 未請求 請求項の数 2 O L (全 3 頁)

(21) 出願番号 特願平10-250888

(22) 出願日 平成10年9月4日(1998.9.4)

(71) 出願人 000002820

大日精化工業株式会社

東京都中央区日本橋馬喰町1丁目7番6号

(72) 発明者 磯野 康幸

東京都中央区日本橋馬喰町一丁目7番6号

大日精化工業株式会社内

(72) 発明者 福島 健司

東京都中央区日本橋馬喰町一丁目7番6号

大日精化工業株式会社内

(74) 代理人 100077698

弁理士 吉田 勝広 (外1名)

最終頁に続く

(54) 【発明の名称】 アスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステルの製造方法

(57) 【要約】

【課題】 加水分解酵素（プロテアーゼ）を用い、高基質濃度でジペプチド（アスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステル）を合成する方法を提供すること。

【解決手段】 N-置換アスパラギン酸（A）とフェニルアラニン低級アルキルエステル塩酸塩（B）とをプロテアーゼの存在下に反応させてペプチド合成するに際し、酵素反応基質として、基質Aと基質Bおよびこれらの基質の濃度がそれぞれの水に対する溶解度以上の濃度となる量のアルカリ性水溶液からなるペーストを用いることを特徴とするアスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステルの製造方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 N-置換アスパラギン酸（A）とフェニルアラニン低級アルキルエステル塩酸塩（B）とをプロテアーゼの存在下に反応させてペプチド合成するに際し、酵素反応基質として、基質Aと基質Bおよびこれらの基質の濃度がそれぞれの水に対する溶解度以上の濃度となる量のアルカリ性水溶液からなるペーストを用いることを特徴とするアスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステルの製造方法。

【請求項2】 該ペーストは、更に有機溶媒を基質Aおよび基質Bの濃度が上記の濃度となる量含まれている請求項1に記載のアスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステルの製造方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、プロテアーゼを利用してペプチド合成する際に、高濃度基質ペーストを用いたアスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステルの合成法に関するものである。

【0002】

【従来の技術】プロテアーゼは加水分解酵素として、タンパク質、ポリペプチドの加水分解反応に幅広く利用されている。一方、加水分解反応の逆反応を利用した有用ペプチドの合成に関する研究も増加している。しかしながら、基質となるアミノ酸の水に対する溶解度は必ずしも高くなく、低濃度基質を用いざるをえない場合も多い。

【0003】一般に、反応平衡定数Kcは質量保存則に従い、次のように表すことができる。

$$Kc = \frac{[P]}{[S_1] \cdot [S_2]}$$

（S₁、S₂：基質濃度 P：生産物濃度）従って、基質濃度を高めることで高い生産物濃度を得ることができる。

【0004】プロテアーゼを用いたペプチド合成の例として、人工甘味料アスパルテームの前駆体であるN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパルチル-L-フェニルアラニンメチルエステル（以下ではZAPMと略記することがある。）が挙げられる。ところで、上記合成に用いられる基質のN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸（以下ではZAと略記することがある。）およびL-フェニルアラニンメチルエステル（以下ではPMと略記することがある。）は、いずれも水に対する溶解度が1～1.5M程度と低いため、数百mM程度の基質を用いた報告例が多い。

【0005】

【発明が解決しようとする課題】先に述べたように、高濃度基質を用いることにより高い反応速度、生産物濃度を得ることが期待でき、また、反応器容積の低減も可能である。しかしながら、基質の水等に対する溶解度が低

いために、高濃度基質での反応のメリットが享受できないのが現状である。従って、本発明の目的は、プロテアーゼを用い、高基質濃度でジペプチド（アスパルチルフェニルアラニン低級アルキルエステル）を合成することができる方法を提供することである。本発明者らは、上記目的を達成すべく種々検討した結果、ZAの粉末とフェニルアラニン低級アルキルエステル（以下ではPh eORと略記することがある。）塩酸塩の粉末及び極少量のアルカリ性水溶液を混合してペースト状としたものに酵素を加えて反応を行わせたところ、高収率で目的物質ZAPMが得られることを見出し、この知見に基づいて本発明を完成するに至った。

【0006】

【課題を解決するための手段】上記の目的は以下の本発明によって達成される。即ち、本発明は、N-置換アスパラギン酸（A）とフェニルアラニン低級アルキルエステル塩酸塩（B）とをプロテアーゼの存在下に反応させてペプチド合成するに際し、酵素反応基質として、基質Aと基質B及びこれらの基質の濃度がそれぞれの水に対する溶解度以上の濃度となる量のアルカリ性水溶液とからなるペーストを用いることを特徴とするアスパルチルフェニルアルキルエステルの製造方法である。

【0007】

【発明の実施の形態】次に好ましい実施の形態を挙げて本発明を更に詳細に説明する。本発明のプロテアーゼを用いるアスパルチルフェニルアルキルエステルの製造方法は、反応の基質であるN-置換アスパラギン酸とフェニルアラニン低級アルキルエステル（Ph eOR）塩酸塩を、これら基質およびアルカリ性水溶液とからなるペーストに高濃度で含むものを使用することが特徴である。以下では、N-置換アスパラギン酸をN-ベンジルオキシカルボニル-L-アスパラギン酸（ZA）で代表させて、又、フェニルアラニン低級アルキルエステル塩酸塩をL-フェニルアラニンメチルエステル（PM）塩酸塩で代表させて説明するが、本発明はこれらの例に限定されるものではない。

【0008】本発明においては上記のペーストを調製する方法は、両基質とアルカリ水溶液とが混合されてペースト状となる方法であれば、どのような方法でもよく、特に制限されない。ペーストを調製する際のZAとPMの混合比は特に限定されないが、ZA/PMが0.1～1.5（モル比）程度が好ましい。また、アルカリ性水溶液としては、水酸化ナトリウム、水酸化カリウムなどの一般的なアルカリの水溶液が用いられる。アルカリ水溶液の使用量は、ZAとPMの濃度が、これらの水に対する溶解度以上の濃度となる量であり、ペプチドの収率を高めるうえから出来るだけ高濃度となる量が望ましい。アルカリ水溶液の濃度は、特に限定されないが、通常、15N～飽和溶液が好ましい。

【0009】また、上記のペーストに更に有機溶媒を含

有させることもできる。有機溶媒としては、例えば、クロロホルム、ジエチレングリコール、グリセロール、エタノール、メタノール、アセトニトリルなどが挙げられる。有機溶媒の添加量は特に限定されないが、両基質濃度がそれぞれの水に対する溶解度以上の濃度となる量が望ましい。

【0010】本発明で使用するプロテアーゼとしては、例えば、サーモライシン、サーモアーゼなどのバチルス属起源の金属プロテアーゼが好ましく、ストレプトマイセス属起源または緑濃菌起源の金属プロテアーゼなども使用することができる。酵素濃度は、反応が進行する濃度であれば特に限定されない。また、本発明における反応温度は40～60℃が好ましく、これ以外の温度でもペプチド合成は行われるが、実用的な速度は得られ難い。

【0011】本発明で使用するZ A以外のN-置換アスパラギン酸としては、例えば、 ϵ -トトキシカルボニルアスパラギン酸、アセチルアスパラギン酸などが、また、P M塩酸塩以外のフェニルアラニン低級アルキルエステル塩酸塩としては、例えば、フェニルアラニンエチルエステル、フェニルアラニンブチルエステル、フェニ

ルアラニンプロピルエステルなどの塩酸塩が挙げられる。

【0012】

【実施例】次に実施例を挙げて本発明を更に詳細に説明する。文中の％は特に断らない限り重量基準である。

【0013】実施例1

P M粉末215mg (1.0mmol) およびZ A粉末265mg (1.0mmol) に20N水酸化ナトリウム水溶液90 μ lを加え、よく混合してペースト状とした。ペースト中の各物質の濃度は、P M、Z Aともに11.1Mである。上記ペーストにサモアーゼ（大和化成株式会社製）50mgを加えて混合し、50℃で反応を行った。反応液組成はHPLC（高速液体クロマトグラフィ）によって分析した。反応8時間後に4.7mgのZ A P Mを得た。

【0014】実施例2～4

実施例1と同様に、表1に示す濃度条件で反応を行った。反応8時間後に得られたZ A P Mの量を同表に示す。

表1

実施例	ペースト状基質組成				Z A、P M の濃度 (M)	Z A P Mの 得量 (mg)
	Z A (mg)	P M (mg)	aq.20N・NaOH (μ l)	水 (μ l)		
2	265	215	100	50	9.4	234.7
3	265	215	100	150	4.9	368.6
4	265	215	100	300	2.8	380.1

【0015】実施例5

実施例1でペーストにジエチレングリコール100 μ lを加えて、実施例1と同様に反応させた。基質濃度はP M、Z Aとも5Mである。反応8時間後に164.9mgのZ A P Mを得た。

【0016】実施例6

P Mの代わりにフェニルアラニンエチルエステルを用いる以外は実施例2と同様にして反応させた。反応8時間後に208.7mgのペプチドを得た。

【0017】

【発明の効果】以上の本発明によれば、ペースト状基質を用いることにより、基質の溶解度に関わらず高濃度の基質を用いてペプチド合成が可能となった。その結果、反応器容積の縮小化が可能となり、例えば、5M濃度の基質を用いた場合では100mM濃度の基質を用いた場合の50分の1の反応器容積で製造を行うことが可能となり、単位反応器容積あたりのペプチド合成量を著しく向上させることができる。

フロントページの続き

(72) 発明者 星野 明
東京都中央区日本橋馬喰町一丁目7番6号
大日精化工業株式会社内

Fターム(参考) 4B064 AG01 CA02 CA04 CA21 CB26
CC03 CC07 CC09 CD02 CD13
DA10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

 International application No.
 PCT/JP02/03754

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

 Int.Cl⁷ C07C231/02, 231/08, 233/47, C07K1/06, 1/30, 5/075,
 C12P21/02

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

 Int.Cl⁷ C07C231/02, 231/08, 233/47, C07K1/06, 1/30, 5/075,
 C12P21/02

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

 Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)
 CAPLUS (STN), REGISTRY (STN)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X Y	US 4801742 A (W.R. Grace & Co. -Conn.), 31 January, 1989 (31.01.89), Claims; column 3, lines 3 to 21; examples (Family: none)	<u>1, 2, 14, 15</u> 3, 5, 7, 9
Y	JP 2000-78997 A (Dainichiseika Color & Chemical Mfg. Co., Ltd), 21 March, 2000 (21.03.00), Claims (Family: none)	4-10, 12
X Y	WO 98/16546 A1 (Holland Sweetener Co. V.O.F.), 23 April, 1998 (23.04.98), Claims (particularly, Claim 3); page 2, lines 3 to 12 & JP 10-174597 A & US 5837483 A & EP 932616 A1 & CN 1236371 A	<u>11, 13</u> 3-10, 12

☐ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☐ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

 Date of the actual completion of the international search
 12 June, 2002 (12.06.02)

 Date of mailing of the international search report
 25 June, 2002 (25.06.02)

 Name and mailing address of the ISA/
 Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP02/03754

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☐ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:

2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:
(See extra sheet.)

1. ☒ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.

2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.

3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:

4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☒ No protest accompanied the payment of additional search fees.

Continuation of Box No.II of continuation of first sheet(1)

The special technical feature common to claims 1 to 3, 5, 7, 9, 14 and 15 and the parts of claims 10, 12 and 13 depending on claims 5, 7 and 9 (hereinafter referred to as the invention group A) resides in "a process for producing an N-formylamino acid or its salt by reacting an amino acid or its salt with formamide and/or methyl formate".

The special technical feature common to claims 4, 6 and 8 and the parts of claims 10, 12 and 13 depending on claims 4, 6 and 8 (hereinafter referred to as the invention group B) resides in "a process for producing N-formyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester or its L- and/or D-phenylalanine methyl ester adduct by an enzymatic fusion reaction of N-formyl-L-aspartic acid or its salt with L- and/or DL-phenylalanine methyl ester or its salt".

The special technical feature common to claim 11 and the part of claim 13 depending on claim 11 (hereinafter referred to as the invention group C) resides in "a process for converting a phenylalanine methyl ester adduct of N-formyl- α -L-aspartylphenylalanine methyl ester into N-formyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester".

Although "N-formyl-L-aspartic acid or its salt" is common to the invention groups A and B, it is clear that this common matter is not a special technical feature.

Although "N-formyl- α -L-aspartyl-L-phenylalanine methyl ester" is common to the invention groups B and C, it is also clear that this common matter is not a special technical feature.

There is no matter common to the invention groups A and C.

Such being the case, there is no special technical feature common to the invention groups A to C. Therefore, these three groups of inventions cannot be considered as relating to a group of inventions so linked as to form a single general inventive concept.